

PTO 2001-2140.

CY=JP DATE=19931227 KIND=A
PN=05344897

DEGRADATION AND SURFACE TREATMENT OF ALIPHATIC POLYESTER USING ENZYME
[Koso o mochiita shibozoku poriesuteru no
bunkaiho oyobi hyomen shori hoho]

Yoshito Ikada, et al.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
Washington, D.C. April 2001

Translated by: Diplomatic Language Services, Inc.

PUBLICATION COUNTRY (19) : JP

DOCUMENT NUMBER (11) : 05344897

DOCUMENT KIND (12) : A
(13) :

PUBLICATION DATE (43) : 19931227

PUBLICATION DATE (45) :

APPLICATION NUMBER (21) : 07097589

APPLICATION DATE (22) : 19950331

ADDITION TO (61) :

INTERNATIONAL CLASSIFICATION (51) : C12P 7/64; C08G 63/78; C08J 7/00;
C12P 7/02; C12S 3/00; D06M 16/00;
//C08L 11/10; C08L 67:02

DOMESTIC CLASSIFICATION (52) :

PRIORITY COUNTRY (33) :

PRIORITY NUMBER (31) :

PRIORITY DATE (32) :

INVENTOR (72) : IKADA, YOSHITO; HAYASHI, JURO

APPLICANT (71) : AMANO PHARMACEUTICAL CO., LTD.

TITLE (54) : DEGRADATION AND SURFACE TREATMENT
OF ALIPHATIC POLYESTER USING ENZYME

FOREIGN TITLE [54A] : KOSO O MOCHIITA SHIBOZOKU
PORIESUTERU NO BUNKAIHO OYABI
HYOMEN SHORI HOHO

(Claim 1) Degradation of aliphatic polyester so characterized that in a method that degrades aliphatic polyester using lipase, a lipase derived from genus *Pseudomonas* is used.

(Claim 2) Treatment of aliphatic polyester so characterized that a fixed lipase comprised by bonding a lipase capable of degrading aliphatic polyester to a water-soluble high polymer carrier is contacted with an aliphatic polyester.

Detailed Description of the Invention

(Industrial Field of Application) This invention pertains to degradation of biodegradable macromolecular polymers and surface treatment of said macromolecular polymers. More particularly, this invention pertains to degradation of aliphatic polyesters using enzymes, and surface treatment of aliphatic polyester fibers and the like using fixed enzymes.

(Prior Art) Together with metals and ceramics, macromolecular compounds typified by plastics are materials that are intimately connected with life today, and plastic products are widely used not only in foods, clothing, and housing, but also in various industries and in medicine.

However, plastics by prior art developed emphasizing long-term stability do not degrade in the natural environment. Therefore, a large amount of unneeded waste is destroying the environment on a global scale, and has become a major problem.

With people taking greater interest in the problem described above

*Numbers in the margin indicate pagination in the foreign text.

in recent years, so-called biodegradable high polymers that are degraded by microorganisms in nature are being extensively researched and steadily applied.

The objects of the present research include ① high polymers that produce microorganisms, ② natural high polymers derived from plants and animals, and ③ synthetic high polymers. It is difficult to obtain ① and ② that are satisfactory on points such as productivity, while ③, such as typically polyvinyl alcohol, polyethylene glycol, and polyesters, are promising biodegradable high polymers.

It is known that these synthetic high polymers are degraded by microorganisms or enzymes. For example, the water-soluble high polymer of polyvinyl alcohol is degraded by bacteria in soil (*Agric. Biol. Chem.*, vol. 37, p 747 (1973)). Microorganisms are known that degrade the likewise water-soluble high polymer of polyethylene glycol, but as its degree of polymerization increases, this becomes difficult to degrade by bacteria, and 6000 or greater molecular weight polyethylene glycol is especially difficult to degrade by bacteria alone (*J. Ferment. Technol.*, vol. 53, p. 757 (1977)).

In recent years, polyesters, which are high polymers that are not soluble in water, are the most promising biodegradable synthetic high polymers due to their easy workability. In particular, it is reported that the aliphatic polyester of polycaprolactam (hereafter called PCL) is subject to hydrolysis in soil (*Polym. Preprints*, vol. 13, p. 629 (1972)), and degradation of PCL by several lipases has been studied in detail (*Agric. Biol. Chem.*, vol. 52, p. 265 (1977)). On the point that this biodegradation can occur in this way using not only microorganisms,

but also enzymes, aliphatic polyesters are considered especially desirable biodegradable high polymers.

(Problems that the Invention is to Solve) A method for degrading polyesters using lipases is known (Japan Kokai Patent No. 52-82774). The method cited above found that lipases derived from sources such as *Aspergillus niger*, *Geotrichum candidum*, *Rhizopus deremer*, *Rhizopus alizus*, *Candida cylindlasce*, wheat germ, or hog pancreas act on PCL, and showed clearly that lipases derived from genus *Rhizopus* have especially potent degradability.

This degradability is not satisfactory, however, and enzymes that show more potent degradability are strongly desired.

Reflecting on this situation, the present inventors first discovered that lipases that produce microorganisms belonging to genus *Pseudomonas* have extremely potent degradability of aliphatic polyesters compared to lipases derived from genus *Rhizopus* by prior art, and so perfected the present invention.

The present inventors also perfected a method that treats the surface of fiber or the like that has aliphatic polyester as its raw material and can improve the feel of this while maintaining the strength of the fiber or the like by using a fixed lipase that can degrade aliphatic polyester.

(Means of Solving the Problems) Aliphatic polyesters that are the object of degradation in this invention include polyglycoside, polylactic acid, polyhydroxybutyrate, PCL, hydroxyvalerate, and copolymers of these. Of these, PCL and the like are raw materials that have superior degradability.

The first invention of this invention pertains to degradation of aliphatic polyesters using lipases that produce microorganisms belonging to genus *Pseudomonas*.

Regarding lipases that can be used, any lipase can be used so long as it is derived from genus *Pseudomonas* and can degrade aliphatic polyesters. Examples are lipase PS (manufactured by Amano Pharmaceutical Co., Ltd.: derived from *Pseudomonas cepacia*) and lipase AK (manufactured by Amano Pharmaceutical Co., Ltd.: derived from *Pseudomonas fluorescens*). More preferably, lipase PS is used. It does not matter whether these lipases are crude products or highly refined.

It is desirable that the aliphatic polyester that is the object of degradation be dispersed as finely as possible to increase the contact surface with the enzyme. For example, it is desirable to make this a /3 fine fiber, thin film, or powder.

As reaction conditions for degrading aliphatic polyesters using lipases, any conditions can be used so long as they are within a range in which the lipase used shows enzymatic activity, but preferred conditions are 10 to 60°C temperature and in a pH 4 to 9 buffer. Needless to say, the reaction system can be reacted in an appropriate solvent system; for example, a solid system so long as appropriate moisture is present.

The second invention pertains to fixing a lipase that can degrade aliphatic polyesters to an appropriate carrier, and treating the surface of polyesters using said fixed enzyme.

Regarding lipases that can be used, any enzyme can be used so long as it can degrade aliphatic polyesters. Examples are lipase PS

(manufactured by Amano Pharmaceutical Co., Ltd.: derived from *Pseudomonas cepacia*), lipase AK (manufactured by Amano Pharmaceutical Co., Ltd.: derived from *Pseudomonas fluorescens*), and lipase F-AP (manufactured by Amano Pharmaceutical Co., Ltd.: derived from *Rhizopus oryzae*). More preferably, lipase PS and lipase F-AP are used. It does not matter whether these lipases are crude products or highly refined.

The carrier used is preferably a water-soluble high polymer carrier for treating fiber or the like by immersion. For example, besides copoly(methylvinylester-co-maleic anhydride) (MAMEC), examples include polyethylene glycol, polyacrylic acid, polyamine, polyglutamic acid, polylysine, dextran, hydroxyethylcellulose, and carboxymethylcellulose. More preferably, MAMEC is used.

Examples of methods for fixing a lipase to an appropriate carrier are ionic bonding and covalent bonding, but to fix enzymes stably, covalent bonding is preferred. Reactions frequently used as covalent bonding begin with active esterification, and include Schiff base bonding, diazonium coupling, cyan bromide activation bonding, the diisocyanate method, reagent condensation (carbodiimide method), triazinyl derivative bonding, halogenoacetyl derivative bonding, acid azide derivative bonding, and halogenoacetyl derivative bonding. All of these, however, require care such that enzyme activity is not reduced during the enzyme fixing reaction.

As conditions for treating fiber, film, or other products based on aliphatic polyesters using a fixed lipase as described above, any conditions can be used so long as they are within a range in which the lipase used shows enzymatic activity, but the preferred conditions are

10 to 60°C temperature and in a pH 4 to 9 buffer.

Compared to when treated without fixing lipase, treating aliphatic polyester fiber or the like using a fixed lipase in this way can evenly degrade only the surface without sacrificing the drawing strength of this fiber. That is, aliphatic polyester fibers can be obtained that differ in feel by varying immersion time considering factors such as the diameter and degree of polymerization of the fiber to be treated. Needless to say, because the lipase is fixed to a high polymer carrier, it is reusable and also has improved stability.

Below, this invention is explained in detail by working examples. Moreover, this invention is not limited to these.

(Working Examples)

Working Example 1 Degradation of PCL Fiber by Various Lipases

PCL fiber samples were treated using various lipases under the following conditions. After treating, the fiber was measured for weight loss when dry and retention of tensile strength by simple tensile strength measurement. Furthermore, the surface of the fiber samples was observed under a scanning electron microscope.

The enzyme was dissolved in 0.1 M phosphoric acid buffer (pH 7.0) to a concentration of 0.5 W/V%. Approximately 75 mg of undrawn PCL fiber sample (fiber diameter: 275 µm) was placed in said enzyme solution (10 mL), and treated while stirring slowly at 25°C. Reaction conditions and results are shown in Table 1.

TABLE 1

Sample	Source	Weight Before Reacting	Days Reacted	Weight After Reacting	Residual Weight (%)	σ_B	ϵ_B	$\sigma_{B,r}/\sigma_{B,o}$
control	-----	(mg)	(days)	(mg)	(%)	(g)	(%)	
L-PS	<i>Pseudomonas cepacia</i>	75.5	7	74.3	98	595	1250	1.00
L-AK	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	76.9	3	14.5	19	0	0	0
L-F-AP	<i>Rhizopus oryzae</i>	73.3	3	62.5	85	320	450	0.54
L-A-6	<i>Aspergillus niger</i>	76.8	3	34.6	45	35	20	0.06
L-M-10	<i>Mucor javanicus</i>	75.0	7	73.3	98	580	1235	0.97
L-AY30	<i>Candida rugosa</i>	75.3	7	72.2	96	575	1150	0.97
L-PGE	sheep sublingual gland	75.8	7	74.6	98	585	1220	0.98
N-F	<i>Rhizopus niveus</i>	76.5	7	75.6	99	560	1180	0.94
P-F	hog pancreas	76.7	7	75.5	98	570	1200	0.96
		76.9	7	75.8	99	565	1190	0.95

Moreover, in Figure 1, L-PS indicates lipase PS "Amano," L-AK indicates lipase AK "Amano," L-F-AP indicates lipase F-AP-15, L-A-6 indicates lipase A "Amano" 6, L-M-10 indicates lipase M "Amano" 10, L-AY30 indicates lipase AY "Amano" 30, L-PEG indicates lipase PGE "Amano," N-F indicates neurase F, and P-F indicates pancreatin F (all of the above are products manufactured by Amano Pharmaceutical Co., Ltd.).

As is clear from Table 1, lipase derived from *Pseudomonas cepacia* (that is, lipase PS) shows extremely potent degradation activity, and lipase likewise derived from *Pseudomonas fluorescens* (that is, lipase AK "Amano") also has good activity degrading PCL. In addition, lipase derived from *Rhizopus oryzae* (that is, lipase F-AP-15) degrades PCL well, but lipase likewise derived from *Rhizopus niveus* (that is, neurase F) shows hardly any degradation activity. Other lipases also were found to show no degradation activity.

Working Example 2 Biodegradation of Undrawn PCL Fiber by Lipase PS "Amano"

Fiber was reacted in the same way as in Working Example 1 using lipase PS "Amano" at an enzyme concentration of 0.1 W/V%, reaction time and degree of degradation were measured, and change over time in reduction in weight (W_r/W_o) and retention of tensile strength ($\sigma_{B,r}/\sigma_{B,o}$) were found. These results are shown in Table 2 and Figure 1.

TABLE 2

/5

Reaction Time	Weight Before Reacting	Weight After Reacting	Reduction in Weight	σ_B	ϵ_B	$\sigma_{B,r}/\sigma_{B,o}$
(hr)	(mg)	(mg)	(%)	(g)	(%)	
0	74.8	74.4	0.99	570 \pm 55	1210	1.00
5	75.0	68.2	0.91	300 \pm 45	750	0.53
12	75.1	54.9	0.73	150 \pm 35	210	0.26
20	74.9	47.2	0.63	80 \pm 20	125	0.14
30	75.0	37.9	0.51	55 \pm 25	60	0.10
46	75.2	27.8	0.37	10 \pm 10	5	0.02

"0 hours" reaction time indicates results after immersing for one hour in buffer solution without adding any enzyme.

As a result of observing treated PCL fibers under a scanning electron microscope, it was observed that fiber treated for 30 seconds was greatly corroded and degraded by the enzyme.

Working Example 3 Biodegradation of Undrawn PCL Fiber by Lipase AK "Amano"

Fiber was reacted in the same way as in Working Example 1 using lipase AK "Amano" at an enzyme concentration of 0.5 W/V%, reaction time and degree of degradation were measured, and change over time in reduction in weight (W_r/W_o) and retention of tensile strength ($\sigma_{B,r}/\sigma_{B,o}$) were found. These results are shown in Table 3 and Figure 2.

TABLE 3

Reaction Time	Weight Before Reacting	Weight After Reacting	Reduction in Weight	σ_B	ϵ_B	$\sigma_{B,r}/\sigma_{B,o}$
(hr)	(mg)	(mg)	(%)	(g)	(%)	
0	74.8	74.4	0.99	570 \pm 55	1210	1.00
24	75.0	69.0	0.92	410 \pm 45	750	0.72
48	75.1	65.3	0.87	330 \pm 35	210	0.58
72	74.9	62.2	0.83	280 \pm 20	125	0.49
120	75.0	57.0	0.76	180 \pm 25	60	0.32

"0 hours" reaction time indicates results after immersing for one hour in a buffer solution without adding any enzyme.

Working Example 4 Biodegradation of Undrawn PCL Fiber by Lipase F-AP-15

Fiber was reacted in the same way as in Working Example 1 using lipase F-AP-15 at an enzyme concentration of 0.2 W/V%, reaction time and degree of degradation were measured, and change over time in reduction in weight (W_r/W_o) and retention of tensile strength ($\sigma_{B,r}/\sigma_{B,o}$) were found. These results are shown in Table 4 and Figure 3.

TABLE 4

/6

Reaction Time (hr)	Weight Before Reacting (mg)	Weight After Reacting (mg)	Reduction in Weight (%)	σ_B (g)	ϵ_B (%)	$\sigma_{B,r}/\sigma_{B,o}$
0	75.5	75.1	0.99	565 ± 50	1230	1.00
12	75.1	66.1	0.88	380 ± 60	870	0.67
24	75.0	61.7	0.82	275 ± 40	650	0.49
48	75.2	49.6	0.66	100 ± 45	145	0.18
75	75.1	41.1	0.55	15 ± 10	30	0.03
144	75.5	36.2	0.48	0	0	0

"0 hours" reaction time indicates results after immersing for one hour in a buffer solution without adding any enzyme.

Working Example 5 Effect of Enzyme Concentration on Biodegradation of Undrawn PCL Fiber by Lipase PS "Amano"

Fiber was reacted in the same way as in Working Example 2 using lipase PS "Amano" and varying enzyme concentration from 0.065 to 0.2 W/V%, reaction time and degree of degradation were measured, and change over time in reduction in weight (W_r/W_o) was found to find dependency on reaction time, and $(W_r/W_o)^t$ was found to study dependency on enzyme concentration. These results are shown in Table 5 and Figures 4 and 5.

TABLE 5

/7

Enzyme Concentration (W/V%)	Reaction Time (hr)	Weight Before Reacting W_o (mg)	Weight After Reacting W_r (mg)	Reduction in Weight W_r/W_o	$(W_r/W_o)^{1/2}$
0.065	5	73.5	68.3	0.93	0.96
	12	73.8	61.3	0.83	0.91
	20	73.5	55.1	0.75	0.87
	30	73.6	48.9	0.66	0.81
	48	74.0	40.7	0.55	0.74
0.10	5	75.0	68.2	0.91	0.95
	8	74.4	59.5	0.80	0.89
	12	75.1	54.9	0.73	0.85
	20	74.9	47.2	0.63	0.79
	30	75.0	37.9	0.51	0.71
	46	75.2	27.8	0.37	0.61
0.15	4	73.9	63.5	0.86	0.93
	8	73.5	54.3	0.74	0.86
	12	73.8	47.2	0.64	0.80
	18	73.7	36.8	0.50	0.71
	24	73.8	28.0	0.38	0.62
	40	73.5	16.9	0.23	0.48
0.20	4	74.0	60.6	0.82	0.91
	8	73.9	48.0	0.65	0.81
	15	74.0	31.1	0.42	0.65
	22	74.2	20.0	0.27	0.52
	30	73.8	11.8	0.16	0.40
	42	74.0	7.7	0.10	0.32

In all cases, it is considered that degradation showed satisfactory linearity initially, and proceeded by a first-order reaction of degradation speed to the fiber surface area.

Working Example 6 Degradation of PCL Fiber Using Lipase PS "Amano"
Fixed to a Water-Soluble High Polymer

5.0 g MAMEC of approximately 20,000 molecular weight were dissolved in 90 mL 0.1 M acetic acid buffer (pH 5.4). 1.0 g of the enzyme lipase PS "Amano" was dissolved in 10 mL of the same buffer. After reacting,

unreacted enzyme was removed by fraction refining using a 100,000 molecular-weight fraction ultrafilter. After condensing, then freeze-drying, a MAMEC-fixed enzyme was obtained. As a result of quantifying by the ninhydrin method, enzyme concentration was 4.5 wt%.

Fiber was reacted in the same way as in Working Example 4 using the lipase PS "Amano" fixed to a water-soluble high polymer obtained as described above at an enzyme concentration of 0.1 W/V%, reaction time and degree of degradation were measured, and change over time in reduction in weight (W_r/W_o) and retention of tensile strength ($\sigma_{B,r}/\sigma_{B,o}$) were found. These results are shown in Table 6 and Figure 6.

TABLE 6

/8

Reaction Time (hr)	Weight Before Reacting (mg)	Weight After Reacting (mg)	Reduction in Weight (%)	σ_B (g)	ϵ_B (%)	$\sigma_{B,r}/\sigma_{B,o}$
0	75.0	74.8	1.00	560 \pm 55	1250	1.00
10	75.2	66.2	0.88	470 \pm 25	700	0.84 \pm 0.04
20	74.9	60.7	0.81	410 \pm 40	450	0.73 \pm 0.07
30	75.1	54.9	0.73	350 \pm 35	280	0.63 \pm 0.06
50	75.0	45.1	0.60	275 \pm 45	125	0.49 \pm 0.08
80	75.3	36.0	0.48	175 \pm 55	30	0.31 \pm 0.10

"0 hours" reaction time indicates results after immersing for one hour in buffer solution without adding any enzyme.

As a result of observing treated PCL fiber under a scanning electron microscope, it was observed that the surface of fiber treated for 50 hours was extremely evenly degraded compared to Working Example

2. In addition, as is clear from Figure 6, in spite of there being no great difference in reduction in weight from when unfixed lipase PS "Amano" was used in Working Example 2, no dramatic reduction was found in retention of tensile strength. That is, the surface of PCL fiber was extremely evenly degraded and the fiber surface could be treated.

Working Example 7 Degradation of PCL Fiber Using Lipase AK "Amano" Fixed to a Water-Soluble High Polymer

The same operations as in Working Example 6 were performed using lipase AK "Amano" bonded to a water-soluble high polymer. As a result, although reduction in weight comparable to Working Example 6 showed no great difference from when unfixed lipase AK "Amano" was used in Working Example 3, no dramatic reduction was found in retention of tensile strength and fiber strength was maintained relatively at the same level.

Working Example 8 Degradation of PCL Fiber Using Lipase F-AP-15 Fixed to a Water-Soluble High Polymer

The same operations as in Working Example 6 were performed using lipase F-AP-15 bonded to a water-soluble high polymer. As a result, although reduction in weight comparable to Working Example 6 showed no great difference from when unfixed lipase F-AP-15 was used in Working Example 4, no dramatic reduction was found in retention of tensile strength.

(Effects of the Invention) This invention has the effect that biodegradable macromolecular polymers, especially the aliphatic polyester of polycaprolactam, can be degraded efficiently using lipases derived from genus *Pseudomonas*. Furthermore, this invention has the effect that the surface of PCL fiber or the like can be degraded using

a fixed enzyme obtained by fixing a lipase to a water-soluble high polymer carrier, fiber or the like can be improved in feel, and the strength of said fiber or the like is relatively undamaged during this process.

(Brief Explanation of the Figures)

Figure 1 shows reaction time and change over time in reduction in weight (W_r/W_o) and retention of tensile strength ($\sigma_{B,r}/\sigma_{B,o}$) when lipase PS "Amano" was used in Working Example 2. In the figure, ● indicates reduction in weight, and ○ indicates retention of tensile strength.

Figure 2 shows reaction time and change over time in reduction in weight (W_r/W_o) and retention of tensile strength ($\sigma_{B,r}/\sigma_{B,o}$) when lipase AK "Amano" was used in Working Example 3. In the figure, ● indicates reduction in weight, and ○ indicates retention of tensile strength.

Figure 3 shows reaction time and change over time in reduction in weight (W_r/W_o) and retention of tensile strength ($\sigma_{B,r}/\sigma_{B,o}$) when lipase F-AP-15 was used in Working Example 4. In the figure, ● indicates reduction in weight, and ○ indicates retention of tensile strength.

Figure 4 shows the correlation between reaction time and reduction in weight when lipase PS "Amano" was used in Working Example 4. In the figure, ①, ②, ③, and ④ indicate results when enzyme concentration was 0.065, 0.10, 0.15, and 0.20 W/V%, respectively.

Figure 5 shows the correlation between reaction time and the square root of reduction in weight when lipase PS "Amano" was used in Working Example 4. In the figure, ①, ②, ③, and ④ indicate results when enzyme concentration was 0.065, 0.10, 0.15, and 0.20 W/V%, respectively.

Figure 5 shows reaction time and change over time in reduction in

weight (W_r/W_o) and retention of tensile strength ($\sigma_{B,r}/\sigma_{B,o}$) when lipase SP "Amano" was used in Working Example 6. In the figure, ● indicates reduction in weight, and ○ indicates retention of tensile strength.

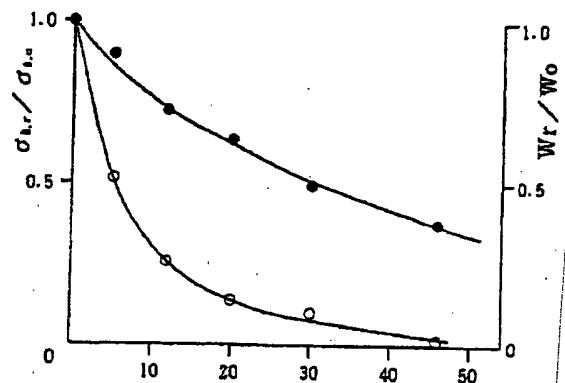


Figure 1
[X-axis:] Reaction Time (hr)

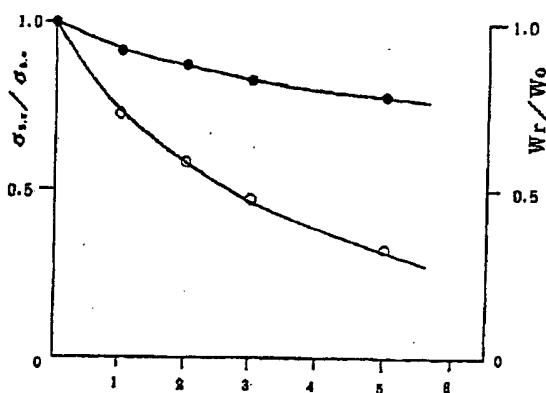


Figure 2
[X-axis:] Reaction Time (hr)

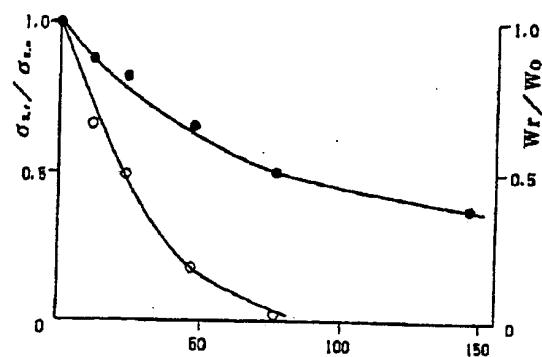


Figure 3
[X-axis:] Reaction Time (hr)

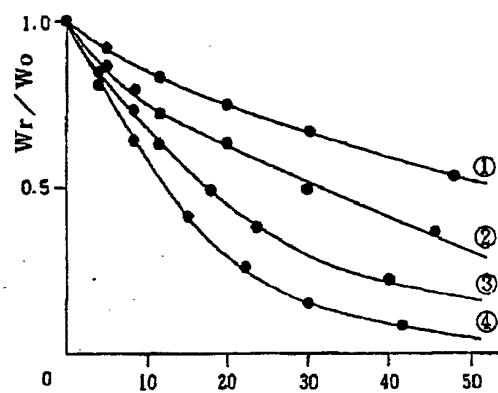


Figure 4
[X-axis:] Reaction Time (hr)

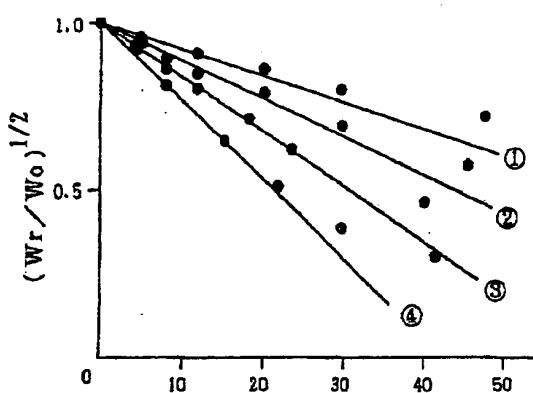


Figure 5
[X-axis:] Reaction Time (hr)

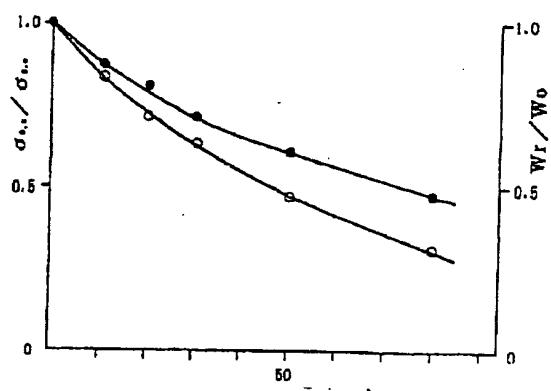


Figure 6
[X-axis:] Reaction Time (hr)

PTO 2001-2140

S.T.I.C. Translations Branch

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-344897

(43)公開日 平成5年(1993)12月27日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 P 7/64		9282-4B		
C 08 G 63/78	NLM	7211-4J		
C 08 J 7/00	CFD Z	7310-4F		
C 12 P 7/02		9282-4B		
C 12 S 3/00				

審査請求 未請求 請求項の数2(全10頁) 最終頁に統く

(21)出願番号	特願平4-179032	(71)出願人	000216162 天野製薬株式会社 愛知県名古屋市中区錦1丁目2番7号
(22)出願日	平成4年(1992)6月12日	(72)発明者	役 義人 京都府宇治市五ヶ庄広岡谷2-182 (72)発明者 林 寿郎 京都市北区小山下内河原町60

(54)【発明の名称】 酵素を用いた脂肪族ポリエステルの分解法及び表面処理方法

(57)【要約】

【目的】生分解性高分子ポリマーの分解法及び該高分子ポリマーの表面処理方法に関する。

【構成】シュードモナス属由来のリバーゼを用いた脂肪族ポリエステルの分解する方法を提供する。更に脂肪族ポリエステルを分解する能力を有するリバーゼを水溶性高分子担体に結合せしめ、当該固定化酵素で脂肪族ポリエステルと接触せしめることにより、その強度を損なうことなく表面を処理することができ、その風合いを改善することができる。

(2)

特開平5-344897

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】リバーゼを用いて脂肪族ポリエステルを分解する方法において、シュードモナス属由来のリバーゼを用いることを特徴とする脂肪族ポリエステルの分解法。

【請求項2】脂肪族ポリエステルを分解する能力を有するリバーゼを水溶性高分子担体と結合してなる固定化リバーゼと脂肪族ポリエステルを接触せしめることを特徴とする脂肪族ポリエステルの処理方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、生分解性高分子ポリマーの分解法及び該高分子ポリマーの表面処理方法に関する。より詳細には、酵素を用いた脂肪族ポリエステルの分解法及び固定化酵素を用いた脂肪族ポリエステル繊維等の表面処理方法に関する。

【0002】

【従来の技術】プラスチックを代表とする高分子化合物は、金属やセラミックとともに現在では生活と緊密な関係のある材料であり、プラスチック製品は衣食住にとどまらず各種産業、医療等に幅広く使用されている。

【0003】しかしながら、長期安定性を重要視して開発されてきた従来のプラスチックは自然環境の中で分解されないため、不要となった大量の廃棄物が地球的規模で環境を破壊しつきな問題となっている。

【0004】近年、上記のような問題に人々の関心が高まる中で、自然の中の微生物により分解される、いわゆる生分解性高分子の研究が盛んに行われ、実用化されつつある。

【0005】現在研究の対象となっているのは、①微生物の生産する高分子、②植物及び動物由来の天然高分子、③合成高分子等が挙げられる。①や②はその生産性等の点で満足するものを得ることが困難であり、ポリビニルアルコール、ポリエチレンゴリコール、ポリエステルに代表される③が生分解性高分子として期待されている。

【0006】これらの合成高分子は微生物や酵素によって分解されるものがあることが知られている。例えば水溶性高分子であるポリビニルアルコールは土壤中の細菌によって分解される〔(Agric. Biol. Chem., 37巻, 747頁(1973))〕。同じく水溶性高分子であるポリエチレンゴリコールを分解する微生物は知られているが、その重合度の増大に伴って細菌による分解は困難となり、特に分子量6,000以上のポリエチレンゴリコールは単独の菌では分解することが困難である〔J. ferment. Techno. 1., 53巻, 757頁(1977)〕。

【0007】また、最近では水に不溶な高分子であるポリエステルはその加工のし易さより、生分解性合成高分子としては最も期待されている。特に脂肪族ポリエステルであるポリカプロラクトン(以下、PCLという)は

2

土壤中で加水分解を受けることが報告〔Polym. Preprints, 13巻, 629頁(1972)〕され、さらに数々のリバーゼによるPCLの分解も詳細に検討されてきた〔Agric. Biol. Chem., 52巻, 265頁(1977)〕。このようにその生分解が微生物のみならず酵素を用いる事によっても行うことができる点で脂肪族ポリエステルはより好ましい性質を有した生分解性高分子と考えられる。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】ポリエステルをリバーゼを用いて分解する方法は知られている(特開昭52-82774)。上記の方法においては、PCLに対しては例えアスペルギルス(Aspergillus)・ニガー、ジオトリカム(Geotrichum)・カンジダム、リゾpus(Rhizopus)・デレマー、リゾpus・アリズス、カンジダ(Candida)・シリンドラッセ、小麦胚芽、豚臍臓の各由来リバーゼが作用することが知られ、特にリゾpus属由来のリバーゼが強い分解力を有している事が明らかにされている。

【0009】しかしながら、その分解力は満足できるものではなく、より強い分解力を示す酵素の開発が強く望まれていた。

【0010】このような状況に鑑み、本発明者らは、シュードモナス(Pseudomonas)属に属する微生物の産生するリバーゼが、従来のリゾpus属由来のリバーゼと比較して非常に強力な脂肪族ポリエステル分解能を有することを始めて見いだして本発明を完成した。

【0011】更に本発明は脂肪族ポリエステル分解能を有するリバーゼを固定化して用いることによって、脂肪族ポリエステルを材料とした繊維等の表面を処理し、繊維等の強度は保持したまま、その風合いを改善することができる方法をも発明完成した。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明の分解対象としての脂肪族ポリエステルとは、ポリグリコシド、ポリ乳酸、ポリヒドロキシブチレート、PCL、ヒドロキシバリエートおよびそれらの共重合体などが挙げられる。その中でも、PCL等は酵素分解性に優れた素材である。

【0013】本発明の第1の発明はシュードモナス属に属する微生物の産生するリバーゼを用いた脂肪族ポリエステルの分解法に関する。

【0014】使用できるリバーゼとしてはシュードモナス属由来で脂肪族ポリエステル分解能を有するリバーゼであれば何れでも使用できる。例えリバーゼPS(天野製薬製: シュードモナス・セバシア由来)、リバーゼAK(天野製薬製: シュードモナス・フローレッセンス由来)が挙げられる。より好ましくはリバーゼPSが使用できる。これらのリバーゼは粗製品であっても高度に精製されていてもかまわない。

【0015】分解対象の脂肪族ポリエステルは酵素との接触面積を大きくするためにできるだけ細かく分散させ

50

(3)

特開平5-344897

4

3
ることが望ましく、例えば細い繊維状、薄い膜状、粉末状とすることが望ましい。

【0016】リバーゼを用いて脂肪族ポリエステルを分解する反応条件は、使用するリバーゼが酵素活性を示す範囲であればいずれの条件でも使用できるが、好ましくは温度は10~60°Cで、pH4~9の緩衝液中である。もちろん、反応系に適当な溶媒系、例えば適当な水分が存在すれば固体系で作用させることもできる。

【0017】第2の発明は脂肪族ポリエステル分解能を有するリバーゼを適当な担体に固定化し、当該固定化酵素を用いてポリエステルの表面を処理する方法に関する。

【0018】本発明に使用できるリバーゼは脂肪族ポリエステルを分解できる酵素であれば何れでも使用できる。例えばショードモナス属由来、リゾプス属由来の酵素が好適に利用できる。より具体的に示すと例えばリバーゼPS(天野製薬製: シュードモナス・セバシア由来)、リバーゼAK(天野製薬製: シュードモナス・フローレッセンス由来)、リバーゼF-AP(天野製薬製: リゾプス・オリゼ由来)が挙げられる。より好ましくはリバーゼPS、リバーゼF-APが使用できる。これらのリバーゼは粗製品であっても高度に精製されてもかまわない。

【0019】用いる担体としては繊維などを浸漬処理するためには水溶性の高分子担体が好ましく、例えばコポリ(メチルビニルエーテル/無水マレイン酸)[Copoly(methylvinylester-co-maleic anhydride)](MAMEC)の他に、ポリエチレンジリコール、ポリアクリル酸、ポリアミン、ポリグルタミン酸、ポリリシン、デキストラン、ヒドロキシエチルスター、カルボキシメチルセルロース等が挙げられる。より好ましくはMAMECが使用できる。

【0020】当該担体にリバーゼを固定化する方法としては、例えばイオン結合法および共有結合法があるが、酵素を安定的に固定化するためには共有結合法が望ましい。共有結合法として良く用いられる反応としては、活性エステル化法をはじめ、シップ塩基結合法、ジアゾニウムカップリング法、臭化シアン活性化結合法、ジイソ

シアネット法、縮合試薬(カルボジイミド法)、トリアジニル誘導体結合法、ハロゲノアセチル誘導体結合法、酸アシド誘導体結合法、ハロゲノアセチル誘導体結合法等があるが、酵素固定化反応に際しては酵素の活性を低下させない様に注意する必要がある。

【0021】上記のようにして固定化したリバーゼを用いて脂肪族ポリエステルを材料とした繊維又はフィルム等を処理する条件としては使用するリバーゼが酵素活性を示す範囲であればいずれの条件でも使用できるが、好ましくは温度は10~60°Cで、pH4~9の緩衝液中である。

【0022】このような固定化したリバーゼを用いて脂肪族ポリエステル繊維などを処理するとリバーゼを固定化しないで処理した時と比較して、その繊維の延伸強度を損なうことなく表面のみを均一に分解することができる。つまり、浸漬時間を処理する繊維径や重合度などを考慮して変化させることによって風合いの異なった脂肪族ポリエステル繊維を得ることができる。もちろんリバーゼは高分子担体に固定化されているため再利用が可能であり、かつ安定性も向上する。

【0023】以下、本発明について実施例を示して詳細に説明する。尚、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0024】

【実施例】

実施例1 各種リバーゼのPCL繊維の分解

各種リバーゼを用いて、PCL繊維を試料として以下の条件に従って処理した。処理後の繊維について乾燥時の重量減少、単純抗張力測定により抗張力保持率を求めた。さらに繊維試料の表面性状を走査型電子顕微鏡で観察した。

【0025】0.1Mのリン酸緩衝液(pH7.0)に0.5W/V%となるように酵素を溶解し、該酵素液(10ml)にPCL未延伸繊維試料(繊維径275μm)約75mgを入れ、25°Cで緩やかにかき混ぜながら処理する。その反応条件及び結果を表1に示す。

【0026】

【表1】

(4)

特開平5-344897

5

6

試 料	起 源	反応 前 の 重 量	反応 日 数	反応 後 の 重 量	重 量 の残 存 率	σ_B	ϵ_B	$\sigma_{B,r} / \sigma_{B,o}$
対 照	-----	(mg) 75.5	(日) 7	(mg) 74.3	(%) 98	(g) 595	(%) 1250	1.00
L-PS	Pseudomonas cepacia	76.9	3	14.5	19	0	0	0
L-AK	Pseudomonas fluorescens	73.3	3	62.5	85	320	450	0.54
L-F-AP	Rhizopus oryzae	76.8	3	34.6	45	35	20	0.06
L-A-6	Aspergillus niger	75.0	7	73.3	98	580	1235	0.97
L-M-10	Mucor javanicus	75.3	7	72.2	96	575	1150	0.97
L-AY30	Candida rugosa	75.8	7	74.6	98	585	1220	0.98
L-PGE	小羊舌下腺	76.5	7	75.6	99	560	1180	0.94
N-F	Rhizopus niveus	76.7	7	75.5	98	570	1200	0.96
P-F	Hog pancreas	76.9	7	75.8	98	565	1190	0.95

【0027】尚、表1中でL-PSはリバーゼPS「アマノ」、L-AKはリバーゼAK「アマノ」、L-F-APはリバーゼF-AP-15、L-A-6はリバーゼA「アマノ」6、L-M-10はリバーゼM「アマノ」10、L-AY30はリバーゼAY「アマノ」30、L-PGEはリバーゼPGE「アマノ」、N-FはニューラーゼF、P-FはパンクレアチンF（以上、いずれも天野製薬製商品名）を示す。

【0028】表1からも明らかのようにシュードモナス・セバシア由来のリバーゼ、即ちリバーゼPS「アマノ」が非常に強い分解活性を示し、同じくシュードモナス属であるシュードモナス・フローレッセンス由来のリバーゼ、即ちリバーゼAK「アマノ」もPCLを良く分解する活性を有している。また、リゾプス・オリゼ由来のリバーゼ、即ちリバーゼF-AP-15もPCLを良く分解 *

30*するが、同じリゾプス属であるリゾプス・ニベウス由来のリバーゼ、即ちニューラーゼFはほとんど分解活性を示さず、他のリバーゼも分解活性を示さないことが判る。

【0029】実施例2 リバーゼPS「アマノ」によるPCL末延伸繊維の生分解

リバーゼPS「アマノ」を用い、酵素濃度を0.1W/V%で実施例1と同様にして反応し、反応時間と分解度合いを測定し、重量減少率(W_t / W_0)および抗張力残存比($\sigma_{B,r} / \sigma_{B,o}$)の経時的変化を求めた。その結果を表2及び図1に示す。

【0030】

【表2】

40

(5)

特開平5-344897

7

8

反応時間	反応前の重量	反応後の重量	重量の減少率	σ_B	ϵ_B	$\sigma_{B,r} / \sigma_{B,o}$
(時間) 0	(mg) 74.8	(mg) 74.4	(%) 0.99	(g) 570±55	(%) 1210	1.00
5	75.0	68.2	0.91	300±45	750	0.53
12	75.1	54.9	0.73	150±35	210	0.26
20	74.9	47.2	0.63	80±20	125	0.14
30	75.0	37.9	0.51	55±25	60	0.10
46	75.2	27.8	0.37	10±10	5	0.02

【0031】反応時間が0時間は酵素無添加の緩衝液中で1時間浸漬した結果を示した。

【0032】また、処理したPCL繊維を走査型電子顕微鏡で観察した結果、30時間処理した繊維は酵素によって大きく侵食されて分解している事が観察された。

【0033】実施例3 リバーゼAK「アマノ」によるPCL未延伸繊維の生分解

*リバーゼAK「アマノ」を用い、酵素濃度を0.5W/V%で実施例1と同様にして反応し、反応時間と分解度合いを測定し、重量減少率(W_r / W_0)および抗張力残存比($\sigma_{B,r} / \sigma_{B,o}$)の経時的变化を求めた。その結果を表3及び図2に示す。

【0034】

* 【表3】

反応時間	反応前の重量	反応後の重量	重量の減少率	σ_B	ϵ_B	$\sigma_{B,r} / \sigma_{B,o}$
(時間) 0	(mg) 74.8	(mg) 74.4	(%) 0.99	(g) 570±55	(%) 1210	1.00
24	75.0	69.0	0.92	410±45	750	0.72
48	75.1	65.3	0.87	330±35	210	0.58
72	74.9	62.2	0.83	280±20	125	0.49
120	75.0	57.0	0.76	180±25	60	0.32

【0035】反応時間が0時間は酵素無添加の緩衝液中で1時間浸漬した結果を示した。

【0036】実施例4 リバーゼF-AP-15によるPCL

未延伸繊維の生分解

リバーゼF-AP-15を用い、酵素濃度を0.2W/V%で実施例1

と同様にして反応し、反応時間と分解度合いを測定し、*

※重量減少率(W_r / W_0)および抗張力残存比($\sigma_{B,r} / \sigma_{B,o}$)の経時的变化を求めた。その結果を表4及び図3に示す。

【0037】

【表4】

(6)

特開平5-344897

9

10

反応時間 (時間)	反応前の 重量 (mg)	反応後の 重量 (mg)	重量の減 少率 (%)	σ_B (g)	ε_B (%)	$\sigma_{B,r} / \sigma_{B,0}$
0	75.5	75.1	0.99	565±50	1230	1.00
12	75.1	66.1	0.88	380±60	870	0.67
24	75.0	61.7	0.82	275±40	650	0.49
48	75.2	49.6	0.66	100±45	145	0.18
75	75.1	41.1	0.55	15±10	30	0.03
144	75.5	36.2	0.48	0	0	0

【0038】反応時間が0時間は酵素無添加の緩衝液中で1時間浸漬した結果を示した。

【0039】実施例5 リバーゼPS「アマノ」によるPCL末延伸繊維の生分解に及ぼす酵素濃度の影響

リバーゼPS「アマノ」を用い、酵素濃度を0.065~0.2W/V%と変化させて実施例2と同様にして反応し、反応時*

*間と分解度合いを測定し、重量減少率 (W_r / W_0) の経時的变化を求めて反応時間依存度及び $(W_r / W_0)^{1/2}$

を求めて酵素濃度依存度を検討した。その結果を表5、図4及び図5に示す。

【0040】

【表5】

(7)

特開平5-344897

11

12

酵素濃度 (W/V%)	反応時間 (時間)	反応前の 重量 W _o (mg)	反応後の 重量 W _r (mg)	重量の減 少率 W _r /W _o	(W _r /W _o) ^{1/2}
0.065	5	73.5	68.3	0.93	0.96
	12	73.8	61.3	0.83	0.91
	20	73.5	55.1	0.75	0.87
	30	73.6	48.9	0.66	0.81
	48	74.0	40.7	0.55	0.74
0.10	5	75.0	68.2	0.91	0.95
	8	74.4	59.5	0.80	0.89
	12	75.1	54.9	0.73	0.85
	20	74.9	47.2	0.63	0.79
	30	75.0	37.9	0.51	0.71
	46	75.2	27.8	0.37	0.61
0.15	4	73.9	63.5	0.86	0.93
	8	73.5	54.3	0.74	0.86
	12	73.8	47.2	0.64	0.80
	18	73.7	36.8	0.50	0.71
	24	73.8	28.0	0.38	0.62
	40	73.5	16.9	0.23	0.48
0.20	4	74.0	60.6	0.82	0.91
	8	73.9	48.0	0.65	0.81
	15	74.0	31.1	0.42	0.65
	22	74.2	20.0	0.27	0.52
	30	73.8	11.8	0.16	0.40
	42	74.0	7.7	0.10	0.32

【0041】いずれの場合も分解の初期では良好な直線性が示され、分解速度が繊維の表面積に対して一次反応で進むと考えられる。

【0042】実施例6 水溶性高分子に固定化したリバーゼPS「アマノ」を用いたPCL繊維の分解 平均分子量約20,000のMAMEC 5.0gを0.1M-酢酸緩衝液(pH5.4) 90mLに溶解させる。リバーゼPS「アマノ」酵素1.0gを同上緩衝液10mLに溶解させ、両者を20°Cで混合し、24時間攪拌反応させる。反応後、100,000分子量分画様限外ろ過膜を用いて分画精製することにより未反応の酵素を除去し、濃縮後凍結乾燥してMAMEC-固*

* 定化酵素を得る。ニンヒドリン法により固定化酵素濃度 30 を定量した結果、4.5wt%が得られた。

【0043】上記で得られた水溶性高分子に固定化したリバーゼPS「アマノ」を用い、酵素濃度を0.1W/V%で実施例4と同様にして反応し、反応時間と分解度合いを測定し、重量減少率(W_r/W_o)および抗張力残存比(σ_{B,r}/σ_{B,o})の経時的变化を求めた。その結果を表6及び図6に示す。

【0044】

【表6】

(8)

特開平5-344897

13

14

反応時間	反応前の重量	反応後の重量	重量の減少率	σ_B	ε_B	$\sigma_{B,r}/\sigma_{B,0}$
(時間)	(mg)	(mg)	(%)	(g)	(%)	
0	75.0	74.8	1.00	560±55	1250	1.00
10	75.2	66.2	0.88	470±25	700	0.84±0.04
20	74.9	60.7	0.81	410±40	450	0.73±0.07
30	75.1	54.9	0.73	350±35	280	0.63±0.06
50	75.0	45.1	0.60	275±45	125	0.49±0.08
80	75.3	36.0	0.48	175±55	30	0.31±0.10

【0045】反応時間が0時間は酵素無添加の緩衝液中で1時間浸漬した結果を示した。

【0046】また、処理したPCL繊維を走査型電子顕微鏡で観察した結果、50時間処理した繊維の表面は実施例2の時と比較して非常に均一に分解されていることが観察された。また、図6よりも明らかなように、重量減少率は実施例2の固定化されていないリバーゼPS「アマノ」を用いた時と大差なく変化しているにもかかわらず、抗張力残存比の急激な低下はみられない。つまり、PCL繊維の表面が非常に均一に分解され、繊維の表面を処理することができた。

【0047】実施例7 水溶性高分子に固定化したリバーゼAK「アマノ」を用いたPCL繊維の分解
水溶性高分子と結合したりバーゼAK「アマノ」を用いて、実施例6と同様にして操作した。その結果実施例6と同様に重量減少率は実施例3の固定化されていないリバーゼAK「アマノ」を用いた時と大差はなかったが、抗張力残存比に急激な低下はみられず、繊維の強度は比較的の保持していた。

【0048】実施例8 水溶性高分子に固定化したリバーゼF-AP-15を用いたPCL繊維の分解
水溶性高分子と結合したりバーゼF-AP-15を用いて、実施例6と同様にして操作した。その結果実施例6と同様に重量減少率は実施例4の固定化されていないリバーゼF-AP-15を用いた時と大差はなかったが、抗張力残存比に急激な変化はみられなかった。

【0049】

【発明の効果】本発明により生分解性高分子ポリマー、とりわけ脂肪族ポリエチレンであるポリカプロラクトンをシードモナス属由来のリバーゼを用いて効率よく分*

*解することができる。さらにリバーゼを水溶性高分子担体に固定化することによって得られた固定化酵素を用いるとPCL繊維などの表面を分解して繊維などの風合いを改良することができ、この際には当該繊維などの強度を比較的損なわないという効果がある。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例2のリバーゼPS「アマノ」を用いた時の反応時間と重量減少率(W_t/W_0)および抗張力残存比($\sigma_{B,t}/\sigma_{B,0}$)の経時的变化を示す。図中で●は重量減少率を示し、○は抗張力残存比を示す。

【図2】実施例3のリバーゼAK「アマノ」を用いた時の反応時間と重量減少率(W_t/W_0)および抗張力残存比($\sigma_{B,t}/\sigma_{B,0}$)の経時的变化を示す。図中で●は重量減少率を示し、○は抗張力残存比を示す。

【図3】実施例4のリバーゼF-AP-15を用いた時の反応時間と重量減少率(W_t/W_0)および抗張力残存比($\sigma_{B,t}/\sigma_{B,0}$)の経時的变化を示す。図中で●は重量減少率を示し、○は抗張力残存比を示す。

【図4】実施例4のリバーゼPS「アマノ」を用いたときの反応時間と重量減少率の関係を示す。図中で①、②、③及び④は各々酵素濃度が0.065、0.10、0.15及び0.20W/V%の時の結果を示す。

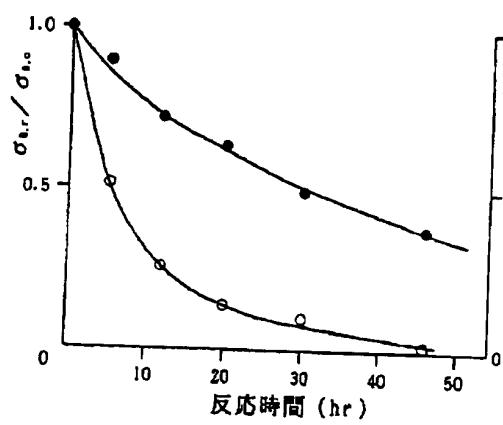
【図5】実施例4のリバーゼPS「アマノ」を用いたときの反応時間と重量減少率の平方根の関係を示す。図中で①、②、③及び④は各々酵素濃度が0.065、0.10、0.15及び0.20W/V%の時の結果を示す。

【図6】実施例6の固定化したりバーゼSP「アマノ」を用いた時の反応時間と重量減少率(W_t/W_0)および抗張力残存比($\sigma_{B,t}/\sigma_{B,0}$)の経時的变化を示す。図中で●は重量減少率を示し、○は抗張力残存比を示す。

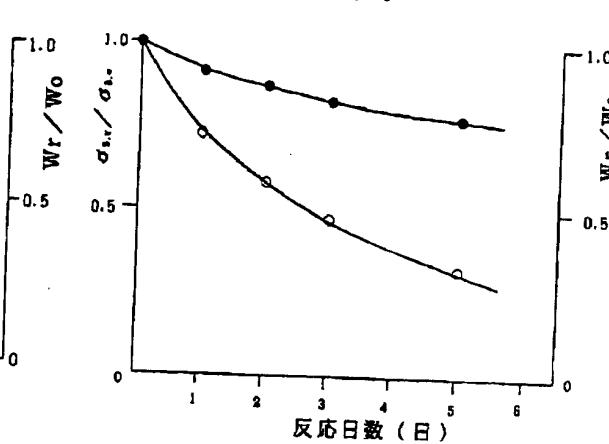
(9)

特開平5-344897

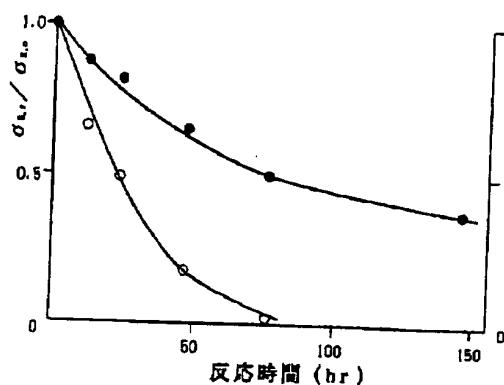
【図1】



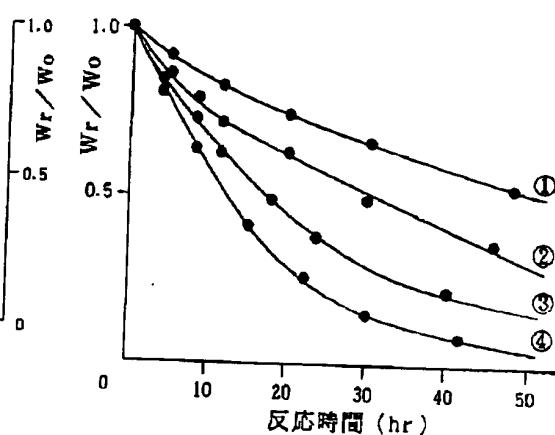
【図2】



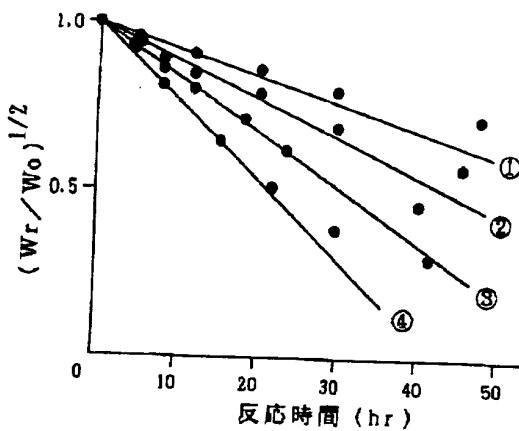
【図3】



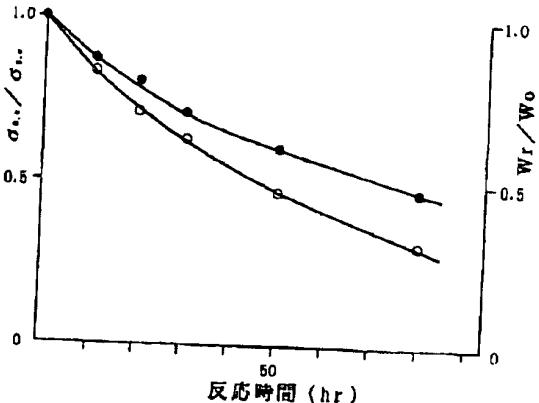
【図4】



【図5】



【図6】



(10)

特開平5-344897

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
D O 6 M 16/00	Z	7199-3B		
// C O 8 J 11/10	C F D	7310-4F		
C O 8 L 67:02		8933-4J		